

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 2003-194812
(43) Date of publication of application : 09.07.2003

(51) Int. CI. G01N 33/53
C12M 1/00
C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 33/566
G01N 37/00

(21) Application number : 2001-397016 (71) Applicant : MITSUBISHI HEAVY IND LTD
(22) Date of filing : 27.12.2001 (72) Inventor' : SAKAI TAKUMA
INUZUKA HIROMASA
UCHIUMI ATSUSHI
TAWARA SATOSHI
NAKAYAMA HIROYUKI

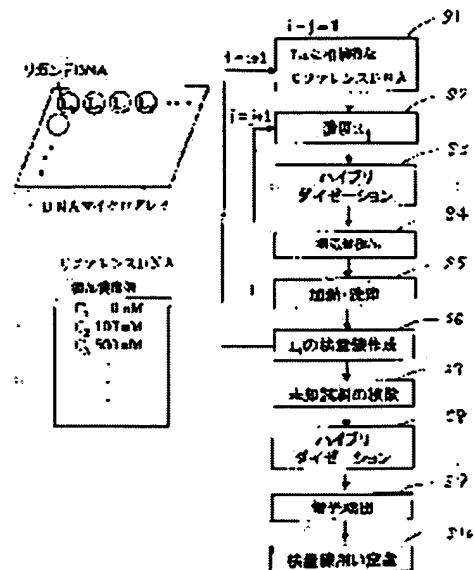
(54) MICRO-ARRAY AND MEASURING METHOD USING THIS MICRO-ARRAY

/

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a micro-array for improving quantitatively determining performance in a measuring method using the micro-array, and the measuring method using this micro-array.

SOLUTION: This measuring method uses the micro-array, and is constituted so as to specify a unknown sample by determining the concentration of the unknown sample by applying a labeling quantity to an analytical curve by after being obtained by measurement after labeling and adding the unknown sample to a ligand by using the analytical curve expressed by a labeling quantity to the concentration of a reference obtained by labeling, adding, and hybridizing the complementary reference to the ligand arranged and fixed in a plurality on the micro-array in plural kinds of concentration.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.12.2001

[Date of sending the examiner's decision
of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right.]

Copyright (C) 1998-2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-194812

(P2003-194812A)

(43)公開日 平成15年7月9日(2003.7.9)

(51)Int.Cl.
G 0 1 N 33/53
C 1 2 M 1/00
C 1 2 N 15/09
C 1 2 Q 1/68
G 0 1 N 33/566

識別記号

F I
G 0 1 N 33/53
C 1 2 M 1/00
C 1 2 Q 1/68
G 0 1 N 33/566

37/00 102

マークト*(参考)
M 4 B 0 2 4
A 4 B 0 2 9
A 4 B 0 6 3

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-397016(P2001-397016)

(22)出願日 平成13年12月27日(2001.12.27)

(71)出願人 000006208

三菱重工業株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番1号

(72)発明者 坂井 琢磨

神奈川県横浜市金沢区幸浦一丁目8番地1
三菱重工業株式会社基盤技術研究所内

(72)発明者 犬塚 博誠

神奈川県横浜市金沢区幸浦一丁目8番地1
三菱重工業株式会社基盤技術研究所内

(74)代理人 100057874

弁理士 曽我 道照 (外6名)

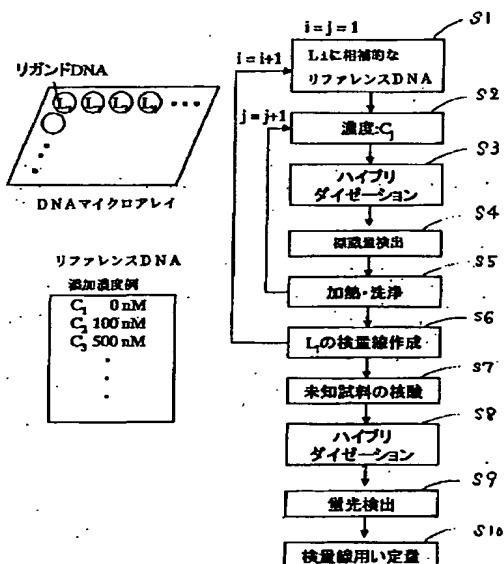
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マイクロアレイ及びこれを用いた測定方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、マイクロアレイを用いた測定方法における定量性を向上させるためのマイクロアレイ及びこれを用いた測定方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明によるマイクロアレイを用いた測定方法は、マイクロアレイ上に複数配置固定されたリガンドに相補的なリファレンスDNAを標識して複数種類の濃度で添加し、ハイブリダイゼーションによって得る前記リファレンスDNAの濃度に対する標識量で表される検量線を用い、前記リガンドに未知の試料を標識して添加した後に測定して得られる標識量を前記検量線に当てはめることにより、前記未知の試料の濃度を求め、これにより、前記未知の試料を特定する構成である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数のリガンドが配置固定されるマイクロアレイであって、未知の試料には含まれない配列の検定用リガンドを少なくとも一つ備え、前記マイクロアレイ上に複数配置固定されたリガンドに相補的なリファレンスを標識して複数種類の濃度で添加してハイブリダイズさせて得る前記リファレンスの濃度に対する標識量で表される検量線に、前記リガンドに未知の試料を標識してハイブリダイズさせることにより得られる標識量を当てはめることにより、前記未知の試料の濃度を繰り返し測定する際に、前記検定用リガンドと相補的な検定用試料を同時にハイブリダイズさせ、ハイブリダイズ後の前記検定用リガンドの検定用標識量を測定することにより、繰り返し測定する毎に耐久性を検定することができることを特徴とするマイクロアレイ。

【請求項2】 前記リガンドは、互いに類似性のない配列のリガンドが配置固定された複数のスポットから構成されるグループ毎にまとめてハイブリダイズされるようにグループ分けされていることを特徴とする請求項1記載のマイクロアレイ。

【請求項3】 マイクロアレイ上にそれぞれ配置固定された複数種類のリガンドに相補的なリファレンスを標識して複数種類の濃度で添加し、ハイブリダイズさせることによって得る前記リファレンスの濃度に対する標識量で表される検量線を用い、前記リガンドに未知の試料を標識して添加した後に測定して得られる標識量を前記検量線に当てはめることにより、前記未知の試料の濃度を求めることが特徴とするマイクロアレイを用いた測定方法。

【請求項4】 前記マイクロアレイは、前記未知の試料には含まれない配列の検定用リガンドを少なくとも一つ備えており、前記未知の試料の濃度を繰り返し測定する際に、前記検定用リガンドと相補的な検定用試料を同時に添加してハイブリダイズさせ、ハイブリダイズ後の前記検定用リガンドの検定用標識量を測定することにより、繰り返し測定する毎に耐久性を検定することができることを特徴とする請求項3記載のマイクロアレイを用いた測定方法。

【請求項5】 前記リガンドは、互いに類似性のない配列のリガンドが配置固定された複数のスポットから構成されるグループに分けて構成されており、各グループ毎にまとめてハイブリダイズすることを特徴とする請求項3または4記載のマイクロアレイを用いた測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、マイクロアレイ及びこれを用いた測定方法に関し、特に、マイクロアレイによる測定方法における定量性を向上できるようにするための新規な改良に関する。

【0002】

【従来の技術】DNAマイクロアレイの開発により、生体中の様々なmRNAの発現量を同時に把握することがより簡便になった。従来行われていた発現量を把握する一般的な方法では、まず、発現量を測定したい目的サンプルと、その基準となる対照サンプルからmRNAを抽出、精製し、逆転写酵素、オリゴdTプライマー及び一部を標識したdNTPでcDNAを合成する。

【0003】次に、サンプルを識別するための標識として一般的な蛍光色素を用いるが、目的サンプル及び対照サンプルで標識は異なるものとする。例えば、目的サンプルには赤い蛍光色素、対照サンプルには緑の蛍光色素を用いる。これらを精製した後に混合してDNAマイクロアレイへ添加し、ハイブリダイゼーションを行った後に標識量を測定する。標識として蛍光色素を用いた場合は蛍光強度を測定する。このような方法により、目的サンプル及び対照サンプルに対応する標識cDNAの比により、発現量の比を把握していた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従来の測定方法は以上のように構成されていたため、次のような課題が存在していた。すなわち、目的サンプルと対照サンプルの発現量比は分かるが、絶対的な発現量を定量的に把握することができなかった。

【0005】本発明は、以上のような課題を解決するためになされたもので、特に、マイクロアレイによる測定方法における定量性を向上させるためのマイクロアレイ及びこれを用いた測定方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明のマイクロアレイは、複数のリガンドが配置固定されるマイクロアレイであって、未知の試料には含まれない配列の検定用リガンドを少なくとも一つ備え、前記マイクロアレイ上に複数配置固定されたリガンドに相補的なリファレンスを標識して複数種類の濃度で添加してハイブリダイズさせて得る前記リファレンスの濃度に対する標識量で表される検量線に、前記リガンドに未知の試料を標識してハイブリダイズさせることにより得られる標識量を当てはめることにより、前記未知の試料の濃度を繰り返し測定する際に、前記検定用リガンドと相補的な検定用試料をハイブリダイズさせ、ハイブリダイズ後の前記検定用リガンドの検定用標識量を測定することにより、繰り返し測定する毎に耐久性を検定することができる構成である。

【0007】また、前記リガンドは、互いに類似性のない配列のリガンドが配置固定された複数のスポットから構成されるグループ毎にまとめてハイブリダイズされるようにグループ分けしている。

【0008】また、本発明のマイクロアレイを用いた測定方法は、マイクロアレイ上に複数配置固定されたりガンドに相補的なリファレンスを標識して複数種類の濃度

で添加し、ハイブリダイズさせることによって得る前記リファレンスの濃度に対する標識量で表される検量線を用い、前記リガンドに未知の試料を標識して添加した後に測定して得られる標識量を前記検量線に当てはめることにより、前記未知の試料の濃度を求める構成である。

【0009】また、前記マイクロアレイは、前記未知の試料には含まれない配列の検定用リガンドを少なくとも一つ備えており、前記未知の試料の濃度を繰り返し測定する際に、前記検定用リガンドと相補的な検定用試料を同時にハイブリダイズさせ、ハイブリダイズ後の前記検定用リガンドの検定用標識量を測定することにより、繰り返し測定する毎に耐久性を検定することができる構成である。

【0010】さらに、前記リガンドは、互いに類似性のない配列のリガンドが配置固定された複数のスポットから構成されるグループに分けて構成されており、各グループ毎にまとめてハイブリダイズする構成である。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、図面と共に本発明によるマイクロアレイ及びこれを用いた測定方法の好適な実施の形態について詳細に説明する。本発明のマイクロアレイを用いた測定方法では、DNAマイクロアレイ上の各スポットに配置固定されるリガンド用のDNA（以下、リガンドDNAと称する）につき、リファレンス用のDNA（以下、リファレンスDNAと称する）の濃度と標識量との検量線を作成する。また、未知の試料である目的サンプル及び対照サンプルは、別個にハイブリダイゼーションを行うこととする。具体的には以下のように行う。

【0012】図1は、本発明のマイクロアレイを用いた測定方法のフローを示すフローチャートである。図1に示すように、まず、DNAマイクロアレイ上のスポット L_i に結合しているリガンドDNAに対して相補的な配列を持ち、かつ蛍光色素等で標識したリファレンスDNAを作成する（ステップS1）。リファレンスDNA1個当たりの標識量は、サンプル由来のcDNAと同じ標識量にする必要があるため、各リファレンスDNAの標識付けは同様な条件で行なうことが望ましい。

【0013】次に、前記スポット L_i に配置固定したリガンドDNAに添加するリファレンスDNAの濃度 $C_{1,i}$ を決定し（ステップS2）、このリファレンスDNAをスポット L_i に添加してハイブリダイズさせる（ステップS3）。スポット L_i におけるハイブリダイゼーション後のDNA（リガンドDNAにリファレンスDNAを添加したDNA）の標識量を測定する（ステップS4）。なお、リファレンスDNAを添加しないブランク（リファレンスDNA添加濃度が0nM）のスポットを少なくとも1点含ませておくと、このブランクのスポットにおける標識量を予め測定しておくことにより、後述するステップS5の後において洗浄度を確認する際に有

用である。

【0014】ハイブリダイゼーション後は、DNAマイクロアレイを95°C程度に加熱することにより、ハイブリダイズされたリファレンスDNAをリガンドDNAから解離させ、DNAマイクロアレイを洗浄する（ステップS5）。この洗浄に際しては、尿素やホルムアルデヒド等の変性剤を使用することにより、DNAマイクロアレイの加熱温度を低く抑えることができる。さらに、洗浄後にスポット L_i のDNAの標識量を測定し、ハイブリダイゼーション前に予め測定しておいたブランクのスポットにおける標識量と比較してリファレンスDNAが十分に解離したことを確認する。

【0015】ステップS5の洗浄後は、ステップS2に戻り、前回とは異なる濃度 $C_{1,i+1}$ のリファレンスDNAを用いてハイブリダイゼーション（S3）、標識量の検出（S4）及び加熱・洗浄（S5）を用意したリファレンスDNAの濃度の種類数だけ繰り返し行う。

【0016】次に、リファレンスDNAの濃度 $(C_{1,1}, C_{1,2}, \dots)$ と標識量をプロットすることにより図2に示すような検量線をプロットする（ステップS6）。これにより、スポット L_i についての検量線を得ることができる。ステップS6が終了すると、フローはステップ1にリターンし、スポット L_{i+1} に配置固定されているリガンドDNAに対して相補的な配列を持ち、かつ蛍光色素等で標識したリファレンスDNAが作成される（ステップS1）。

【0017】さらに、フローはステップS2～S6へ進行し、各スポットについてステップS2～S5を繰り返し実行しながら、全てのスポット (L_1, L_2, \dots) について検量線が作成される。このようにして、DNAマイクロアレイ上の2点以上のスポットに配置固定したリガンドDNAに対して異なる濃度のリファレンスDNAを添加してハイブリダイズさせることにより、各スポットに配置固定されたリガンドDNAについての検量線を得る。

【0018】なお、上述のように各スポットについて別々にハイブリダイゼーションを実行させてもよいが、各濃度及び各スポットについて互いの配列に類似性がなければ複数のスポットで同時にハイブリダイズさせても問題は生じない。この場合は、上述のステップS1～S6をスポット数分だけ繰り返し行う必要はなくなる。

【0019】以上のようにして各スポットについての検量線を作成した後、未知の試料を用意し（ステップS7）、この未知の試料を各スポットに添加してハイブリダイズさせ（ステップS8）、同様に標識量を測定し（ステップS9）、測定データを検量線に適用することにより未知の試料におけるDNA量を算出できる（ステップS10）。

【0020】このような作業は、未知の試料である目的サンプル及び対照サンプルについて別個に行なうものであ

り、これにより、目的サンプル及び対照サンプルのそれぞれの標識が重なって見えなくなることや、お互いのリガンドDNAを取り合うこと等による悪影響を排除できるので、上述した検量線を用いて未知の試料のDNA量を高精度に定量化することができる。特に、従来は目的サンプル及び対照サンプルが一対として用いられており、対照サンプルについても何回もDNA量を測定する必要があったが、本発明のマイクロアレイでは、上述した検量線を用いて絶対量を検出しているため、対照サンプルについては1回の測定で済ませることができる。

【0021】また、上述のように一つのDNAマイクロアレイを何度も繰り返し使用する場合は、リガンドDNAの耐久性について検定する必要が生じるが、未知の試料の測定の前後に各リガンドに相補的なリファレンスDNAを毎回同じ濃度で添加してハイブリダイズさせ、標識量を確認すれば、各スポットに配置固定されたリガンドDNAの劣化の度合いを確認できると共に、劣化による補正值を求めてハイブリダイゼーションの再現性を高精度に把握することができる。

【0022】さらに、このような耐久性の検定は、DNAマイクロアレイ上の全てのスポットで行う必要はなく、少なくとも1つのスポットで検定することにより全体のスポットの耐久性を推定しても問題は生じない。この場合、未知の試料及び各リガンドには含まれない配列の検定用DNAを少なくとも1つのスポットに配置固定しておき、未知の試料と共に前記検定用DNAと相補的なDNAを一定量混入させてハイブリダイズさせ、DNAとのハイブリダイゼーション後の検定用DNAの検定用標識量を繰り返し測定する毎に確認すれば、DNAマイクロアレイの耐久性を検定することができる。また、未知試料等のハイブリダイズを行う、行わないに拘わらず、一定時間の間隔を置いて複数回測定することでリガンドDNAの保存性も調べることができる。

【0023】このようなリファレンスDNAを使用した規格化は、保存性が十分であればリガンドDNAのスポット後いつ行ってもよいので、例えばDNAマイクロアレイのメーカーが各アレイの検量線データを取得し、ユーザーがアレイと共に検量線データを受け取り、未知試料の測定を行うという形態も考えられる。この場合の検量線データのメディアは磁気ディスク等でもよいし、DNAマイクロアレイのシリアルナンバーに対応した検量線データをインターネット等によりメーカーから提供するようにしてもよい。

【0024】また、互いに類似性のない配列のリガンドDNAが配置固定された複数のスポット(L_1, L_{1+1}, \dots)から構成されるグループ G_1 がある場合は、図3に示すステップS11のようにグループ毎にまとめてキャリブレーションすることができる。このような場合は、ステップS11でグループ G_1 に含まれる各スポットに配置固定されているリガンドDNAに対して相補的

な配列を持ち、かつ蛍光色素等で標識したリファレンスDNAを作成する(ステップS11)。これに続くステップS12～S20は、図1に示すステップS2～S10に相当するものであるため、詳しい説明は省略する。なお、図3に示すフローでは各グループ G_1 に含まれる各リガンドDNAに相補的なリファレンスDNAの各成分濃度を同一にしているが、この濃度は任意に設定できるものである。

【0025】以上の説明では、リガンドとしてDNAを用い、かつ、リファレンスとしてもDNAを用いた場合について説明したが、リガンドはDNAに限られるものではなく、RNAやその他の核酸及びタンパク質等であってもよい。また、リファレンスもDNAに限られるものではなく、RNAやその他の核酸及びタンパク質であっても良く、これらをリガンド及びリファレンスとして用いた場合でも上述の場合と同様に本発明を実施でき、同様の効果を得ることができる。

【0026】

【発明の効果】本発明のマイクロアレイは、複数のリガンドが配置固定されるマイクロアレイであって、未知の試料には含まれない配列の検定用リガンドを少なくとも一つ備え、前記マイクロアレイ上に複数配置固定されたリガンドに相補的なリファレンスを標識して複数種類の濃度で添加してハイブリダイズさせて得る前記リファレンスの濃度に対する標識量で表される検量線に、前記リガンドに未知の試料を標識してハイブリダイズさせることにより得られる標識量を当てはめることにより、前記未知の試料の濃度を繰り返し測定する際に、前記検定用リガンドと相補的な検定用試料を一定量混入させてハイブリダイズさせ、ハイブリダイズ後の前記検定用リガンドの検定用標識量を測定することにより、繰り返し測定する毎に耐久性を検定することができる、繰り返し使用可能であると共に高精度に未知の試料の種別を特定することができる。また、繰り返し使用を促進しマイクロアレイの廃棄量を低減することができる。

【0027】また、前記リガンドは、互いに類似性のない配列のリガンドが配置固定された複数のスポットから構成されるグループ毎にまとめてハイブリダイズされるようグループ分けして配置固定されているので、検量線を簡単に求めることのできるマイクロアレイを提供することができる。

【0028】また、本発明のマイクロアレイを用いた測定方法は、マイクロアレイ上に複数配置固定されたリガンドに相補的なリファレンスを標識して複数種類の濃度で添加し、ハイブリダイズさせることによって得る前記リファレンスの濃度に対する標識量で表される検量線を用い、前記リガンドに未知の試料を標識して添加した後に測定して得られる標識量を前記検量線に当てはめることにより、前記未知の試料の濃度を求めるので、未知の試料量を高精度に定量化し、種別を特定することができ

四〇

【0029】また、前記マイクロアレイは、前記未知の試料には含まれない配列の検定用リガンドを少なくとも一つ備えており、前記未知の試料の濃度を繰り返し測定する際に、前記検定用リガンドと相補的な検定用試料をハイブリダイズさせ、ハイブリダイズ後の前記検定用リガンドの検定用標識量を測定することにより、繰り返し測定する毎に耐久性を検定することができるので、高精度に未知の試料の種別を特定することができる。

【0030】さらに、前記リガンドは、互いに類似性のない配列のリガンドが配置固定された複数のスポットか*

* ら構成されるグループに分けて構成されており、各グループ毎にまとめてハイブリダイズするので、検量線を簡単に求めることのできるマイクロアレイを用いた測定方法を提供することができる。

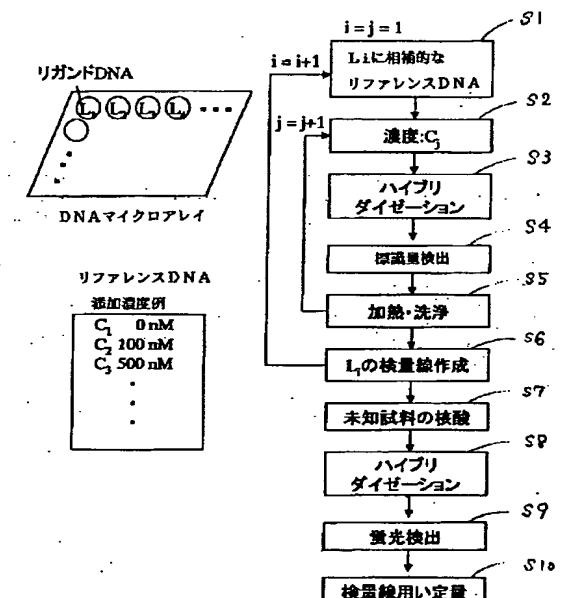
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によるマイクロアレイを用いた測定方法の測定手順を示すフローチャートである。

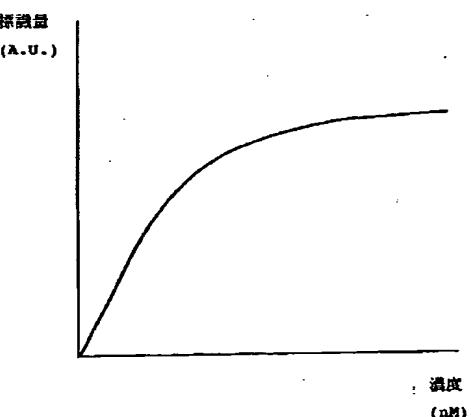
【図2】本発明によるマイクロアレイを用いた測定方法によって求まる検量線を表す特性図である。

【図3】本発明によるマイクロアレイを用いた測定方法の他の測定手順を示すフローチャートである。

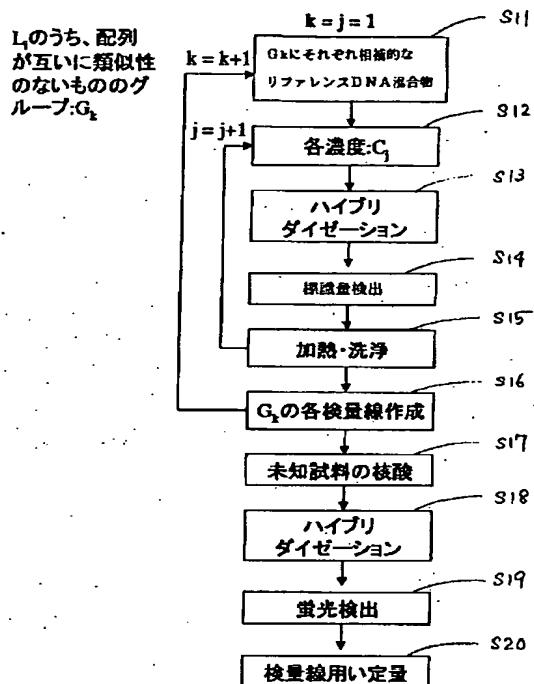
[図1]



[図2]



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.C1. ⁷ G 0 1 N 37/00	識別記号 1 0 2	F I C 1 2 N 15/00	テーマコード(参考) F
---	---------------	----------------------	-----------------

(72)発明者 内海 淳
神奈川県横浜市金沢区幸浦一丁目8番地1
三菱重工業株式会社基盤技術研究所内
(72)発明者 田原 諭
神奈川県横浜市金沢区幸浦一丁目8番地1
三菱重工業株式会社基盤技術研究所内

(72)発明者 中山 博之
神奈川県横浜市金沢区幸浦一丁目8番地1
三菱重工業株式会社基盤技術研究所内
F ターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA09 CA11
HA12
4B029 AA07 BB20 CC03 FA12
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08
QR32 QR42 QR55 QR82 QS34
QS36 QX02